

Brunner, Prof. Dr. Karl, Inspector }  
 der städt. Untersuchungsanstalt für } Prag (durch  
 Nahrungsmittel, Wenzelsplatz 53, } G. Goldschmidt  
 Gotz, R., Königl. Weinberge, } und H. Mayer);  
 Bauer, Dr. Felix, Berlin (durch C. Willgerodt und  
 K. Scheid);  
 Ganz, Theodor, Göthestrasse 50, Freiburg i. B. (durch  
 F. Gaess und K. Scheid).

Der Vorsitzende:  
 C. Liebermann.

Der Schriftführer:  
 A. Pinner.

## Mittheilungen.

### 107. Eduard Buchner: Ueber zellenfreie Gährung.

(Vortrag, gehalten vor der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin,  
 am 14. März 1898.)

M. H.! Die alkoholische Gährung des Zuckers hat schon vielfach das Interesse der Naturforscher erregt. Zahlreiche Theorien über das Zustandekommen dieses Processes folgten aufeinander, bis die bahnbrechenden Arbeiten Pasteur's, begonnen in der Mitte unseres Jahrhunderts, zur endgültigen Aufstellung des Satzes führten: Keine Gährung ohne Organismen. Im Speciellen betrachtete Pasteur den Vorgang als einen physiologischen Act, eng und untrennbar verknüpft mit den Lebensvorgängen der Hefezellen. Andere Forscher dagegen, wie Moritz Traube, Berthelot, Liebig und Hoppe-Seyler waren der Ansicht, dass die Hefe, wie sie einen bestimmten chemischen Stoff, ein unorganisirtes Ferment oder Enzym, das Invertin, producirt, welches Rohrzucker in Traubenzucker und Fruchtzucker spaltet, dass sie wohl ähnlich auch eine Substanz erzeuge, der die Gährwirkung zukommt. Aber, so anschaulich diese Theorie war, es fehlte jeder experimentelle Beweis, denn niemals konnte trotz vieler Versuche eine Trennung des Gährvermögens von den lebenden Hefezellen erzielt werden. Die rein vitalistische Theorie blieb also unbedingt Siegerin.

Wir alle sind in den Anschauungen Pasteur's aufgewachsen. Als mir im October 1896 experimentelle Thatsachen in die Hände fielen, die für eine zellenfreie Gährung zu sprechen schienen, da stand ich denselben daher begreiflicher Weise zunächst sehr zweifelnd

gegenüber. Erst nachdem zwei Monate später wiederholte Versuche genau zu den früheren Ergebnissen geführt hatten, erfolgte die Veröffentlichung. Darnach ist es möglich, aus Hefe einen zellenfreien Saft auszupressen, welcher Zucker in Gährung versetzt.

Das Verfahren zur Herstellung des Presssaftes, unter wesentlicher Beihülfe des Hrn. Privatdocenten Dr. Martin Hahn im Münchener hygienischen Institut ausgebildet, ist kurz folgendes. Frische Münchener untergährige Bierpresshefe, bei 50 Atmosphären Druck entwässert, wird mit dem gleichen Gewicht Quarzsand und ein Fünftel des Gewichtes Kieselguhr sorgfältig gemengt und hierauf in einer Zerreibungsmaschine zerrieben; die letztere, von Hugerhoff in Leipzig geliefert und durch einen Gasmotor in Betrieb gesetzt, besteht der Hauptsache nach aus einer horizontal rotirenden Porzellanreibschale, in welcher sich ein beliebig beschwertes Porzellanpistill fortwährend geradlinig hin und her bewegt. Der Process wird erst unterbrochen, wenn die anfangs staubtrockne Masse von selbst feucht geworden ist und sich zusammenballt. Flüssigkeit muss offenbar aus dem Innern der Zellen ausgetreten sein. In der That ergab die mikroskopische Untersuchung, von Hrn. Dr. H. Will freundlichst ausgeführt, dass bereits etwa 40 pCt. der Zellen zerrissen sind. Nun setzt man die teigförmige Masse, in ein Tuch eingeschlagen, in der hydraulischen Presse einem allmählich gesteigerten Druck bis zu 500 Atmosphären aus; die Presse muss selbstverständlich vielfach von Neuem angezogen werden, da der Druck wieder nachlässt. Nach etwa zwei Stunden wird der Presskuchen zerstoßen, mit Wasser angefeuchtet und nochmals demselben hohen Drucke unterworfen. Im Ganzen erhält man bei dieser zweimaligen Pressung aus 1 Kilo Hefe 500 ccm Flüssigkeit, von welchen nur 140 ccm als Wasser zugesetzt wurden. Der Presssaft tropft direct aus der Presse zweckmässig auf ein gewöhnliches Faltenfilter und wird in einem durch Eiswasser gekühlten Gefäss aufgefangen, um einer Veränderung des Saftes schon während der Bereitung möglichst vorzubeugen. Im rückständigen Presskuchen sind bei der mikroskopischen Untersuchung nur mehr etwa 4 pCt. intacte Hefezellen, aber gegen 60 pCt. der früheren Zellen als leere Häute aufzufinden. Durch nochmaliges Zerstoßen, Anfeuchten und Zerpressen des Kuchens liesse sich wohl noch weiterer Saft gewinnen; die Hauptmenge des wirksamen Stoffes ist aber bereits vorher ausgepresst; wenigstens giebt der Rückstand, nach Gewinnung von 500 ccm Saft, mit Zuckerlösung versetzt nur mehr geringe Gährwirkung.

Die aufgestellten Präparate zeigen deutlich den Unterschied im makroskopischen Aussehen der Hefe in den verschiedenen Stadien; zunächst haben Sie hier frische Münchener untergährige Bierpresshefe,

dann solche nach Auspressen bei 50 Atmosphären und Mischen mit Quarzsand und Kieselguhr als trocknes Pulver, hierauf als plastische Masse nach dem Zerreiben und endlich als ziemlich festen Presskuchen am Ende der Gesamtoperation. Der frische Hefepresssaft, wie Sie ihn hier vor sich sehen — dieses Präparat wurde in einem grossen Eiskübel bei 0° von München hierher überführt — stellt eine gelbliche, im durchfallenden Licht fast klare, sonst opalisirende Flüssigkeit von angenehmem Hefegeruch vor; er enthält viel Kohlendioxyd gelöst, welches beim Erwärmen auf 40° zu entweichen beginnt. Im Presssaft sind ziemliche Mengen von gerinnbarem Eiweiss vorhanden; bei langsamem Anheizen in der Bunsenflamme coagulirt meistens die ganze Masse so vollständig, dass das Reagenzrohr ohne Flüssigkeitsverlust umgestürzt werden kann (Versuch).

Im Presssaft sind Enzyme vorhanden, deren Anwesenheit mit Wasserstoffsperoxyd nach Schönbein leicht nachzuweisen ist. Ich setze einerseits zu 1 Raumtheil Presssaft 10 Raumtheile Wasser und nach dem Mischen 6 Raumtheile Wasserstoffsperoxydlösung (von 10 pCt.), andererseits zu 1 Raumtheil Presssaft 8 Raumtheile Wasser, 2 Raumtheile einer 2-procentigen, wässrigen Blausäure und nach dem Schütteln 6 Raumtheile Wasserstoffsperoxydlösung. Im ersteren Falle tritt nahezu augenblicklich unter dem Einfluss der Enzyme stürmische Sauerstoffentwicklung ein, welche zu andauerndem Ueberschäumen der Flüssigkeit aus dem Reagenzrohre führt; im letzteren Fall ist überhaupt kaum Gasentwicklung zu bemerken (Versuch). Verdrängt man aber die zugesetzte Blausäure aus dem Presssaft durch länger fortgesetztes Durchleiten von Luft, so zeigen die Enzyme des Presssaftes wieder die frühere Wirksamkeit gegenüber Wasserstoffsperoxyd. Man wird also eine lockere additionelle Verbindung zwischen Blausäure und Enzym annehmen müssen, die des letzteren Wirkung auf das Hyperoxyd nicht besitzt, aber schon durch Luftzuleiten zersetzt wird. Ebenso verhält sich die Gährwirkung des Presssaftes gegenüber Blausäure.

Von Enzymen ist im Hefepresssaft zunächst Invertin nachgewiesen. Die Gegenwart eines Maltase und eines Glycogen hydrolysirenden Fermentes darf, da beide Kohlenhydrate durch den Presssaft in Gährung gerathen und nach den Erfahrungen Emil Fischer's kaum direct vergähren, wohl angenommen werden; vielleicht auch erfolgt die Hydrolyse in beiden Fällen durch dieselbe Substanz. Dann scheinen Oxydasen vorhanden zu sein, wie solche G. Bertrand in vielen Pflanzensäften vorgefunden hat, wenigstens färbt sich der Presssaft bei längerem Stehen an der Luft, wahrscheinlich unter Sauerstoffaufnahme, braun. Proteolytische Enzyme im Hefepresssaft hat zuerst M. Hahn aufgefunden, indem er dessen Verflüssigungsvermögen für Gelatine feststellte; beim Einsenken von frischem Pres-

saft und von solchem, der etwa eine Woche bei Zimmertemperatur unter Arsenitzusatz gestanden hat, in ein Wasserbad von 50° ist nach einigen Minuten im ersteren ein beträchtliches Gerinnsel ausgeschieden, während sich im letzteren kaum einige Flocken gebildet haben; das gerinnbare Eiweiß ist also durch eine Art von Selbstverdauung — möge dieser kurze Ausdruck gestattet sein — verschwunden (Versuch).

Als interessanteste Eigenschaft des Hefepresssaftes muss aber bezeichnet werden, dass er Zucker in alkoholische Gärung zu versetzen vermag und zwar, wie die Hefe selbst, Rohr-, Malz-, Trauben- und Frucht-Zucker, nicht jedoch Lactose und Mannit.

Die eine dieser Gärungen in den Messcylindern ist vor dreissig Stunden in München durch Mischen von 100 ccm frischem Hefepresssaft mit dem gleichen Volum einer 50-procentigen Saccharoselösung in Gang gesetzt, die zweite mit denselben Bestandtheilen vor zehn Stunden dahier. Zum Vergleiche der Intensität der Gasentwicklung und zugleich der Höhe der Schaumschicht ist endlich ein dritter Messcylinder aufgestellt, beschickt mit 100 ccm 50-procentiger Rohrzuckerlösung, 50 ccm destillirtem Wasser und als Nährmaterial 50 ccm durch Stehen unwirksam gewordenen Hefepresssaft, welcher Mischung vor 10 Stunden 5 g frische Presshefe zugesetzt wurden. Obgleich in letzterem Falle die Flüssigkeit in Folge der vielen suspendirten Hefezellen milchig trübe und undurchsichtig erscheint, übertreffen Gasentwicklung und Schaumschicht durchaus nicht die gleichen Symptome in den beiden fast klaren und durchsichtigen Parallelversuchsflüssigkeiten mit wirksamem Presssaft.

Beim Eingiessen eines Volumens (10 ccm) einer 30° warmen, 50-procentigen Rohrzuckerlösung in 10 ccm frischen Presssaft im Reagenzrohr tritt etwa 10 Minuten nach dem Mischen deutliche Gasentwicklung ein, welche bei Zimmertemperatur einige Tage, bei 7—8° ungefähr eine Woche andauert (Versuch). Beträchtlich rascher noch tritt die Gasentwicklung beim Auflösen von 5 g pulverisirtem Rohrzucker in 15 ccm Presssaft ein; bald nachdem die beim Hin- und Herneigen des Presssaftes zum Zwecke des Auflörens und in Folge nun verminderter Löslichkeit der im Presssaft von Anfang an vorhandenen Kohlensäure entstandenen Blasen entwichen sind, setzt eine regelmässige Gasentbindung ein (Versuch).

Das Gas, welches dabei entsteht, ist Kohlensäure, wie leicht zu beweisen. Dieses mit Quecksilber vollständig gefüllte, in eine Quecksilberwanne gestülpte Eudiometerrohr wurde vor 10 Stunden mittels einer gekrümmten Pipette beschickt mit 15 ccm frischem Presssaft, in welchem 4 g Rohrzucker eben vorher gelöst wurden. Die Gasentwicklung dauert noch an, es sind aber bereits über 50 ccm Gas angesammelt. Ich lasse nun starke Kalilauge dazu treten, verschliesse

mit dem Daumen, schüttele und öffne unter Quecksilber; dasselbe steigt sofort in die Röhre empor; das Gas ist völlig verschwunden.

Bei Anwendung von frischer Münchener untergähriger Bierpresshefe zur Herstellung des Presssaftes wurde in gegen 50 Einzelfällen, die sich über den Zeitraum von 18 Monaten vertheilen, immer gähr-tüchtiger Presssaft erhalten und kein einziger Misserfolg beobachtet. Dabei blieb die Mitwirkung der im unfiltrirten Presssaft noch vorhandenen, verhältnissmässig sehr wenigen Mikroorganismen durch hohe Zuckerconcentration und durch Zusatz von Kaliummetarsenit ausgeschlossen.

Die Gährkraft des nach gleichem Verfahren erhaltenen Presssaftes ist selbst bei stetiger Anwendung von Münchener untergähriger Bierpresshefe aus nämlicher Fabrik nicht immer die gleiche. Insbesondere wurde eine Steigerung derselben bei den Arbeiten in den letzten Wintermonaten beobachtet, was mit dem günstigen Einfluss der niederen Temperatur auf Reinheit der Hefe und Haltbarkeit des Saftes zusammenhängen dürfte. Besonders hohe Kohlensäurezahlen wurden jüngst durch Hrn. Dr. Rudolf Rapp erhalten, als bei Zusatz von 2 pCt. Kaliummetarsenit mit der Zuckerconcentration auf 16 pCt. heruntergegangen worden war; so lieferten 200 ccm vorher evacuirter Presssaft bei 15° in 40 Stunden 15 g Kohlendioxyd.

Aus allen diesen Beobachtungen wurde der Schluss gezogen, dass die lebenden Hefezellen zur Einleitung der alkoholischen Gährung nicht nöthig sind. Der Gährvorgang darf daher nicht als physiologischer Act, d. h. als complicirter Lebensvorgang aufgefasst werden; vielmehr wird er durch eine Enzym-ähnliche Substanz, die Zymase, eingeleitet, welche in der Natur allerdings nur in den lebenden Hefezellen entsteht. Eine Isolirung dieses Stoffes ist vorläufig nicht möglich, einerseits wegen seiner grossen Veränderlichkeit, andererseits wegen der Anwesenheit der übrigen Enzyme.

Gegen diese Folgerungen sind hauptsächlich drei Einwände erhoben worden. Nach dem ersten derselben soll nicht der Presssaft selbst, sondern die in ihm noch vorhandenen Mikroorganismen die Gährung veranlassen. Diese Annahme ist unhaltbar, denn es besitzt auch durch Filtriren keimfrei gemachter Presssaft starke Gährwirkung; ferner bleibt trotz Zusatz von antiseptischen Mitteln, wie arseniger Säure, Chloroform, Benzol, grossen Zucker- oder Glycerin-Mengen, welche die Lebensthätigkeit niederer Organismen hemmen, die Gährkraft des Saftes erhalten; endlich sind in normal hergestelltem, nur durch Papier filtrirtem Presssaft so wenige Mikroorganismen vorhanden, dass sie niemals eine ähnlich lebhaft und vor allem so rasch einsetzende Gasentbindung bewirken könnten.

Ein zweiter Einwurf nimmt an, dass die beobachtete Kohlensäureentwicklung nicht durch alkoholische Gärung, sondern durch einen anderen Vorgang bedingt sei. Ueber die Art des letzteren sprechen sich die Gegner nicht näher aus; man könnte an Athmungserscheinungen oder an Kohlensäureentbindung in Folge Gerinnens von Eiweisskörpern denken. Auch diese Hypothesen sind zu verwerfen, denn eine Gasentwicklung tritt im Presssaft bei gewöhnlicher Temperatur erst nach Zusatz von gährungsfähigem Zucker, nicht von Milchzucker oder von Mannit auf. Ferner entsteht bei dem Vorgang annähernd gleichviel Alkohol und Kohlendioxyd, wie dies auch für die alkoholische Gärung des Zuckers charakteristisch ist; beobachtet werde die Bildung von 6.7 g Kohlendioxyd neben 7.7 g Alkohol. Endlich verschwindet bei dem Prozesse thatsächlich der Zucker und an seiner Stelle erscheinen  $\text{CO}_2$  und Alkohol; ein Versuch ergab: nach 40-stündiger Gärung mit 200 ccm Presssaft unter Kaliummetarsenitzusatz bei  $15^\circ$  verschwanden 33.4 g Zucker, d. h. aller vorhandener; gleichzeitig gebildet wurden 15.1 g  $\text{CO}_2$  und 14.9 g Alkohol, also annähernd gleichviel Kohlendioxyd und Alkohol und zusammen annähernd das Gewicht des verschwundenen Zuckers repräsentirend; bei Vervollkommnung der Methodik wird wahrscheinlich noch grössere Uebereinstimmung zu erzielen sein.

Als dritter Einwand ist schliesslich die Hypothese aufzuführen: im Presssaft vorhandene lebende Plasmatheilchen seien die Ursache von dessen Gährwirkung. Auch diese Annahme ist zu verwerfen, da auch abgetödtete (6 Stunden auf  $100^\circ$  erhitze) Hefe noch Gäbrkraft besitzt; da der Presssaft eingetrocknet oder durch Alkohol gefällt werden kann, ohne seine Wirksamkeit völlig einzubüssen; da allgemeine Plasmagifte, wie arsenige Säure, das Gährvermögen nicht aufheben; endlich da normal hergestellter Presssaft aus sehr lebenskräftiger Hefe vielfach keine Gährwirkung gezeigt hat, obwohl er doch jene hypothetischen Plasmatheilchen enthalten müsste.

Ueber die von zahlreichen anderen Forschern erzielten Misserfolge bei der Herstellung von wirksamem Hefepresssaft sei es mir noch gestattet, einige Vermuthungen zu äussern. In manchen Fällen mag ungenügendes Zerreiben und Auspressen der Hefe daran Schuld tragen; wenigstens findet sich mehrmals die Angabe, dass weniger Presssaft, als nach meinen Mittheilungen zu erwarten, erhalten wurde; d. h. gerade das Beste ist noch im Presskuchen zurückgeblieben, denn bei Beginn der Herstellung wird der erhaltene Presssaft sicher durch aussen an den Zellen haftendes Wasser verdünnt. Zudem ist durchaus nicht jede Hefe, auch nicht jede Bierhefe zur Gewinnung von wirksamem Presssaft geeignet; in gewissen Lebensperioden, bei gewissen Züchtungsverfahren scheinen auch sehr gährkräftige Saccharomyceten vorübergehend keine Zymase zu enthalten. Hefe und Hefe

ist selbst bei gleicher Rasse nicht immer dasselbe, wie dies allerdings bei einem chemisch reinen Präparat zutreffen würde. Ferner verliert wirksamer Presssaft bei längerem Stehen von selbst seine Gährkraft, wahrscheinlich in Folge der Anwesenheit proteolytischer Enzyme; solche können vermuthlich auch innerhalb der Hefezellen die Zymase zerstören. Endlich ist es auch denkbar, dass die Zymase gegen manche chemische Stoffe empfindlich ist, die an nicht sorgfältig ausgewaschenen Hefezellen aussen anhaften. Wenigstens erscheint es auffallend, dass gerade mit der Münchener untergährigen Bierpresshefe, welche besonders genau ausgewaschen wird, so vorzügliche, niemals veragende Resultate erhalten worden sind.

Ueberblicken wir nochmals all' die vorgeführten und berichteten Experimentalthaten, so wird man den Nachweis der Zymase als geliefert betrachten und zugeben müssen, dass es wieder einmal gelungen ist, einen anscheinend rein physiologischen, d. h. auf höchst complicirte Lebensprocesse begründeten Vorgang auf die verhältnissmässig einfache Wirkung eines bestimmten Stoffes zurückzuführen. In dieser Erkenntniss findet eine 1893 mit Constatirung der Zerreibbarkeit auch der kleinsten Mikroorganismen nach Zusatz von Quarzsand begonnene Untersuchungsreihe ihren vorläufigen Abschluss.

### 108. Eug. Bamberger: Zur Kenntniss der Nitrosoalphyhydroxylamine<sup>1)</sup>.

[VIII. Mittheilung über Hydroxylamine.]

(Eingegangen am 14. März; mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. R. Stelzner.)

Die folgenden Zeilen sind dazu bestimmt, die vor mehreren Jahren veröffentlichte Charakteristik des Nitrosophenylhydroxylamins<sup>2)</sup> nach verschiedenen Richtungen zu vervollständigen. Es sei von vornherein bemerkt, dass die vertrautere Bekanntschaft mit diesem Körper mich in dem Glauben an die ursprünglich auf Grund seiner Entstehungsweise aufgestellte Formel,  $C_6H_5 \cdot N \begin{smallmatrix} \text{NO} \\ \text{OH} \end{smallmatrix}$ , wesentlich bestärkt hat.

Hervorzuheben ist vor Allem die grosse Unbeständigkeit, welche das Nitrosamin schon an und für sich zeigt und welche durch die Gegenwart saurer Agentien in unverkennbarer Weise erhöht wird.

<sup>1)</sup> Diese Untersuchung sollte später als Kapitel einer grösseren Abhandlung über Alphyhydroxylamine erscheinen. Der Umstand, dass auch von anderer Seite mit den Nitrosoalphyhydroxylaminen experimentirt wird (diese Berichte 31, 179), veranlasst mich zu der heutigen Mittheilung.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 27, 1553; 28, 246; 29, 2412.